

力蛋白的分子生物学与细胞运动

蒋 传 葵

李 文 杰

(中国科学院上海细胞生物研究所) (中国科学院上海生物化学研究所)

从亚细胞水平和分子生物学水平研究细胞运动(如:肌肉收缩、纤毛和鞭毛的运动、细胞质流动、染色体的分离、伪足的伸展等等)还是近一、二十年的事。我们已经知道肌肉收缩是由于肌动蛋白(actin)和肌球蛋白(myosin)相互作用的结果,七十年代以来另一种和运动有关的大分子系统越来越引起人们的关注,这就是微管蛋白(tubulin)和力蛋白(dynein*)系统,现在已经知道纤毛和真核生物鞭毛的运动就是这两种蛋白质相互作用的结果。

一、力蛋白的发现和定义

1960年 Gibbons^[1] 从大量的电镜观察结果中发现纤毛、原生动物鞭毛和大多数精子尾巴都具有相同的显微结构(见图1),当时对这些结构的化学组成和功能一无所知。众所周知生

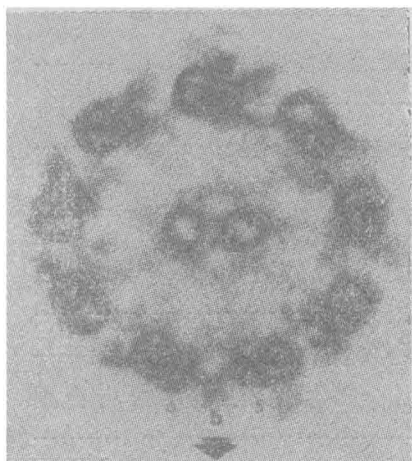


图1 一条分离的已去膜的侧纤毛横切片的电子显微照片(视角为从纤毛基部向顶端)

(引自 Warner, F. D.: *Cell Motility*, 3, 893, 1976)

物运动依赖于ATP的水解,那么纤毛和鞭毛中具有ATP酶活性的成份,一定和运动密切相关。

Gibbons^[2,3] 等人用变性剂除去纤毛膜后,分离到一种具有ATP酶活性的蛋白质,定位在亚纤维A的臂上(图2),他给这类和纤毛、真核生物鞭毛微管系统结合的具有ATP酶活性的一类高分子量蛋白质[分子量为 $(3-6) \times 10^5$]定名为“dynein”(dyne = force:-protein)即力蛋白。

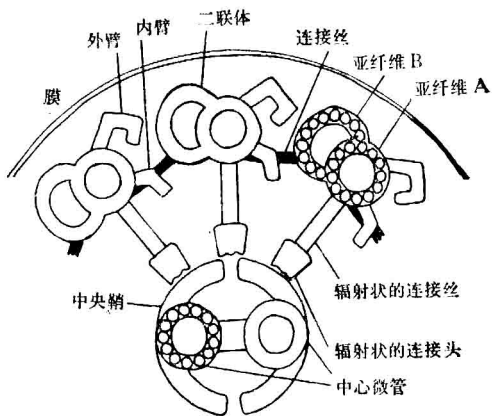


图2 轴纤丝的构造

这是轴纤丝横切面的一部分,只画了三个二联体,整个轴纤丝应有九个二联体

二、纤毛和鞭毛轴纤丝的构造和力蛋白的定位

纤毛和鞭毛普遍存在于原生动物和其他动

* Dynein, 目前未见正式译名,作者暂译为力蛋白。

物的细胞上,原生动物(如草履虫)是单细胞生物,它的表面存在大量纤毛,纤毛有规律颤动使它能浮游并吞食。哺乳动物气管和输卵管内的大量纤毛也是有运动功能的细胞器。纤毛长5—10微米,每个细胞的纤毛是无法计数的。真核生物鞭毛是原生动物和动物精子担负运动功能的细胞器(原核生物鞭毛的构造完全不同,这里不讨论),鞭毛长150微米,每个细胞通常只有1—4根。虽然纤毛和真核生物鞭毛在外形和数目上不同,但它们伸出细胞表面之上的部分(直径约0.15—0.3微米)在电子显微镜下有相同的显微结构,叫轴纤丝。

轴纤丝是纤毛和真核生物鞭毛运动的基本元件,它以下的结构特点。图2表示轴纤丝的横切面(9×2+2)的微管结构图形,最外面由双层膜包围着,中央一对微管由中央鞘包着,外围环绕着9个二联体微管。每个二联体是由亚纤维A和B连接在一起构成的。亚纤维由以α、β微管蛋白异二聚体构成的24nm直径的空心管状的原纤丝组成;亚纤维A由13条原纤丝组成,亚纤维B的10条(Tilney^[4]认为是11条)原纤丝是独用的,其他三条是与亚纤维A合用的,形成两者共用的部分。

在二联体之间的弹性连接丝上发现尼克辛蛋白(nexin),由它构成的连接丝的两个末端分别附着在相邻的两个二联体亚纤维A上。它的作用不清楚,可能是在相邻两个二联体滑动时保持轴纤丝的几何形状。

从每个二联体亚纤维A上伸出二条臂,对着相邻的二联体亚纤维B,臂长约21—26nm,宽9nm,两臂间隔16—22nm,二臂是由一类叫力蛋白的具有ATP酶活性的蛋白质组成,它和纤毛鞭毛的运动有密切关系。亚纤维A上还有辐射状连接丝从A管表面向中心微管伸展,长36nm,它连接辐射状连接头再连接到中心微管的表面。这样在轴纤丝内就有许多辐射状连接丝、纵向排列的臂和连接丝,它们将(9×2+2)微管结构错综复杂地连接在一起,构成纤毛鞭毛运动的结构基础。

三、力蛋白的提取和纯化

从纤毛或鞭毛中提取力蛋白的步骤大同小异。首先将收集到的大量细胞悬浮于乙醇-CaCl₂或甘油或麻醉剂狄布卡因的溶液中,不断搅拌,纤毛即从细胞上脱落。鞭毛可以用匀浆法使其脱落,通过离心法将游离的纤毛或鞭毛

表1 提取和纯化力蛋白的简单步骤

	方 法	纤 毛 力 蛋 白	文 献	鞭 毛 力 蛋 白	文 献
力蛋白制剂的提取	1.收集纤毛或鞭毛	①乙醇-CaCl ₂ 法 ②甘油法 ③Ca ⁺⁺ 存在下用狄布卡因盐酸盐 用离心法收集脱下的纤毛	[2,3] [6] [7]	用匀浆法脱下鞭毛,以蔗糖梯度离心浓集鞭毛并分离精子头和膜等杂质	[5]
	2.除去纤毛或鞭毛的膜	①0.5%(w/v) 毛地黄皂苷 ②1%(w/v) Triton X-100	[3] [8]	①毛地黄皂苷 ②Triton X-100 ③渗透压破裂法	[3] [14] [15]
	3.提取力蛋白制剂	①低盐溶液透析 ②高盐溶液提取	[8,9] [10]	高盐溶液提取	[5]
力蛋白的进一步纯化	1.密度梯度离心	分析超离心法	[11]	5—20% (w/v) 蔗糖 8—30% (w/v) 甘油	[5]
	2.柱层析法	①控孔玻璃(CPG-10)柱层析 ②钙调蛋白-Sepharose 4B亲和层析法	[12] [13]	交联 Sepharose Cl-4B 磷酸纤维素柱层析 羟基磷灰石柱层析	[5] [5] [16]

与细胞体分离并浓集,然后用变性剂除去纤毛或鞭毛的膜,得到裸露的轴纤丝。因介质的离子强度是稳定轴纤丝结构的重要因素,因此将去膜的轴纤丝用低离子强度(1mM 缓冲液和0.1mM EDTA)溶液透析,或用0.5—0.6M 盐溶液提取,都可以将力蛋白从轴纤丝上溶解下来。但这两种方法得到的力蛋白组分是不同的(详见下文)。现将提取和纯化力蛋白的方法列在表1,关于不同来源的力蛋白的性质,请参看文献[5]第392页。

四、力蛋白的性质

1. 力蛋白的组份^[17]

分析力蛋白组份的手段很多,最初用蔗糖密度梯度离心,随着技术进步用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳或 SDS-聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳和双向电泳等。不同来源的纤毛或鞭毛,用不同的提取方法;不同的分析手段,得到的结果是不一致的,因此,力蛋白组份的名称很乱,很难比较。

1980年 Warner^[17] 按提取的方法把力蛋白组份的名称加以归纳。力蛋白的提取可分为二种,一种是用高离子强度溶液提取,一种为低离子强度溶液透析。

从大多数组织中,用0.5—0.6M KCl 溶液提取的样品定名为力蛋白1(也称为力蛋白A或30S力蛋白)它含有约60% ATP酶活性和20% 轴纤丝蛋白质。力蛋白2(也称为力蛋白B或14S力蛋白)不被浓盐溶液提取。力蛋白1定位在轴纤丝亚纤维A的外臂上,而力蛋白2的定位则不清楚。

以低离子强度溶液透析法得到的力蛋白含有95%的ATP酶活性和60% 轴纤丝蛋白质,在蔗糖密度梯度离心中得到20—30S和11—14S两部分,电镜观察透析后的轴纤丝去掉了两个臂和中心微管的复杂物质。

Gibbons 将四膜虫(*Tetrahymena*)的纤毛经低盐溶液透析和蔗糖梯度离心,得到两种力蛋白:30S和14S,它们的性质见表2。轴纤丝中所含30S力蛋白的量是14S的二倍。它们都

表2 四膜虫纤毛30S和14S力蛋白性质比较

	14S 力蛋白	30S 力蛋白
K_m	$3.5 \times 10^{-3} M$	$1.1 \times 10^{-3} M$
最适 pH	6.2—8.5	5.8—9.0
比活力 (μmole 无机磷/ 分·mg 蛋白)	2.7	1.3
Ca^{++} 激活的 ATP 酶活性 Mg^{++} 激活的 ATP 酶活性	约 0.4	约 1.1

不是单一的组成,在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中都能分成多种条带。M. Hoshino, 用脲素、SDS 和蛋白酶处理后,经蔗糖密度梯度离心,成功地将从四膜虫30S力蛋白分成24S、18S、14S三个有ATP酶活性的部分。

B. H. Gibbons 等人从海胆精子鞭毛中成功地分离到四种不同的高分子量蛋白质,用0.5M KCl 溶液提取到的是分子量最大并具有ATP酶活性的力蛋白1,分子量为 $(330 \pm 40) \times 10^3$;力蛋白2的分子量是 $(325 \pm 40) \times 10^3$;另外二个成份无ATP酶活性。

K. I. Nakamura 等人从环虫(*Annelid*)精子鞭毛用 Tris-EDTA 透析法制得力蛋白制剂,该制剂在琼脂糖-聚丙烯酰胺凝胶电泳中分成五种组分,定名为I、II、III、IV和V,其中I、II、III有ATP酶活性,IV、V则没有。该制剂在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中得到五条多肽亚基,定名为A、B、C₁、C₂和C₃,它们的分子量依次为365,000、345,000、310,000、29,000和27,000,其中力蛋白组份I、II、III都含有A多肽,I和II还含有B、C₁和C₃,而III含有另外四种低分子量多肽。

2. 力蛋白的 ATP 酶性质

本文前面曾多处提到力蛋白的ATP酶性质,但不详尽以下再补充三点。

① 潜在的 ATP 酶活性

最近很多人认为力蛋白活力是和提取方法及后处理有关。用浓盐溶液提取的力蛋白1的比活力是很低的,如果用下面所列的任何一种方法处理,ATP酶的比活力会增加几倍到十几

倍。Gibbons^[17] 将具有这种性质的天然形式力蛋白叫具有潜在活性的力蛋白 (latent activity dynein) 简称 LAD。

后处理的方法有：加丙酮处理；加巯基试剂处理^[18]；加 Triton X-100 处理，用 0.1% Triton X-100 在 20℃ 处理 10 分钟^[19]；加 EDTA 处理；老化处理^[17]，42℃ 加热 10 分钟^[19]；加对-氯汞苯基磺酸盐(PCMS)，20℃ 处理 10 分钟^[19]；透析法^[19]等。由于用低盐溶液透析法提取的力蛋白已经过透析处理，因此表现不出潜在的 ATP 酶活性。

虽然后处理可以增加 ATP 酶活性，但是这种被处理后的力蛋白重新结合到去膜轴纤丝上的能力却减少了。处理后的力蛋白分子量也减少了。分子量变小的力蛋白，其 ATP 酶活力增加的原因，目前还不清楚。具有潜在酶活性的天然力蛋白结合到轴纤丝上时，它的 ATP 酶活力也成倍增加。表 3 列出天然力蛋白和经 Triton 处理后的力蛋白性质的比较

表 3 具有潜在 ATP 酶活性的力蛋白和经 Triton 处理后的力蛋白性质的比较

性 质	力蛋白	海胆精子鞭毛力蛋白 1
	具有潜在酶活力的力蛋白	经 Triton 处理后的力蛋白
$K_m (\mu M)$	1.3±0.6	45±9
比活力 ($\mu mole$ 无机磷/分·mg 蛋白)	0.26±0.04	2.7±0.4
S [°] 20, W (S)	21.4±0.6	12.3

② 激活剂和抑制剂

力蛋白 ATP 酶的真正底物是金属离子-ATP 的复合物，而不是游离的 ATP。力蛋白对 ATP 的专一性很强，如以其他核苷三磷酸作力蛋白的底物，则其活力低于 ATP 作底物时活力的十分之一。

力蛋白 1 和 2 都需要二价阳离子的激活，用 Mg⁺⁺ 激活其活性最高，Ca⁺⁺、Mn⁺⁺、Co⁺⁺、Ni⁺⁺ 和 Fe⁺⁺ 对该酶也有激活作用。

增加 KCl 浓度会提高力蛋白 1 的活力，并

抑制力蛋白 2 的活力^[20]。游离 ATP⁴⁻ 是力蛋白的 Mg-ATP 酶的竞争性抑制剂。四膜虫的 30S 力蛋白受 Ca⁺⁺ 所抑制。14S 力蛋白受游离 Mg⁺⁺ 的抑制。测定力蛋白的 K_m 和 K_i 值都较困难，它的 K_m 值在 20—100 μM 之间。

钒酸盐是力蛋白 ATP 酶的非竞争性抑制剂。四膜虫的 30S 和 14S 力蛋白对钒酸盐都很敏感，而它们的 Mg-ATP 酶活性比 Ca-ATP 酶活性对钒酸盐更为敏感。钒酸盐抑制海胆精子鞭毛的微管滑动和哺乳动物细胞的有丝分裂器，但它并不减少和轴纤丝中力蛋白结合的 ATP 量，这说明钒酸盐并不阻止底物结合到活性位点上去，而只影响活性位点的功能。

③ 初始无机磷快速释放的性质

当 ATP 刚加入到力蛋白 ATP 酶的测活系统时，ATP 酶的活力比达到稳定态时的活力大好几倍，这是力蛋白初始无机磷快速释放的原故，这称之为初始无机磷快速释放现象。底物加入 1—2 分钟后，无机磷的释放才达到稳定的速度，0.2M KCl 溶液不影响无机磷的初始突然增加，而影响该系统到达稳定态的时间。

1981 年 Masuyama 测定四膜虫纤毛力蛋白被胰蛋白酶水解的片段，其最高的 ATP 酶比活性达 48 $\mu mole$ 无机磷/分·mg 蛋白。

3. 力蛋白和肌球蛋白物理化学性质的比较

为了弄清纤毛和鞭毛运动的机制，往往将力蛋白和肌肉中肌球蛋白加以比较。现将见于文献中这方面的结果，归纳在表 4 中。

4. 海胆精子鞭毛力蛋白的性质

用 0.5M KCl 溶液提取去膜海胆精子鞭毛，可得到力蛋白 1，它定位在二联体微管的外臂上，含有整个轴纤丝 ATP 酶活性的 70—80%。目前对力蛋白 1 的研究较多。

1983 年 Bell 将海胆精子鞭毛中提取的力蛋白重链在 6M 盐酸胍作用下，用沉降法测得分子量范围是 450,000—500,000 道尔顿，1979 年 Shanina 将定位在二联体微管外臂上的力蛋白 1 提纯到 90%。测得它的 $A_{281}^{1mg/ml} = 0.95 \pm 0.04$ (在 281nm 处)，比活力为 0.5—0.7 $\mu mole$ 无机磷/分·mg 蛋白，由圆二色性光谱测得它含有

表 4 力蛋白和肌球蛋白性质的比较

性 质	力 蛋 白	肌 球 蛋 白
分子量	$(3-6) \times 10^5$	4.6×10^5 [21]
在细胞上的定位	纤毛或真核生物鞭毛的轴纤维二联体亚纤维 A 臂上	横纹肌的粗纤维上 [5]
具有 ATP 酶活力的部分	10~14S, 30S	6S [5]
对底物的专一性	对 ATP 作用专一 ϵ -ATP 和 FTP 不能作为底物	除 ATP 外, ϵ -ATP 和 FTP 也可以作为底物 [22]
初始无机磷快速释放性质	具有 3.5×10^5 分子量的蛋白质其初始无机磷快速释放约为 1mole/1mole	具有 4×10^5 分子量的蛋白质其初始无机磷快速释放约为 1mole/1mole [24]
Ca^{++} 或 Mg^{++} 对 ATP 酶的激活程度	Ca^{++} 或 Mg^{++} 对 ATP 酶的激活程度在同样的数量级水平	Ca^{++} 比 Mg^{++} 对 ATP 酶的激活高二个数量级(缺乏肌动蛋白时) [5]
钒酸盐对 ATP 酶的抑制程度	1 μM 钒酸盐对 ATP 酶抑制 60% 100 μM 钒酸盐对 ATP 酶抑制 95%	100 μM 钒酸盐对 ATP 酶不抑制 1000 μM 钒酸盐对 ATP 酶表现出抑制 [25]
长链的脂酰辅酶 A 对 ATP 酶的作用	在 2—10 μM 范围内对 ATP 酶激活 在高于 20 μM 时是 ATP 酶的非竞争性抑制剂	在 2 μM —10 μM 范围内对 ATP 酶激活, 在高于 20 μM 时是 ATP 酶的抑制剂 [26]
硫脲及其取代物对 ATP 酶的作用	硫脲和其取代物可增加 30S 力蛋白 ATP 酶活性, 而抑制 14S 力蛋白 ATP 酶活性	0.5M 硫脲抑制软体动物肌肉的肌球蛋白体系 [27]
摩擦比 (f/f_0)	LAD-1 $f/f_0 = 1.9$	肌球蛋白的 $f/f_0 = 3.5$ 肌球蛋白的亚碎片 1 的 $f/f_0 = 1.4$ [5] [28]

LAD-1 为海胆精子鞭毛力蛋白 1

ϵ -ATP 为 N⁶-Ethenoadenosine Triphosphate

FTP 为 formycin 5'-triphosphate

表 5 海胆精子鞭毛力蛋白 1 和它的亚基的某些性质*

		多肽链的组成	S ²⁰ , W (S)	分子量	摩擦比 f/f_0	$K_m (\mu\text{M})$	比活力 $\mu\text{mole Pi/分} \cdot \text{mg}$
LAD-1		$A_\alpha \sim 330,000$ $A_\beta \sim 320,000$ IC1 122,000 IC2 90,000 IC3 76,000 LC1-424,000 -14,000	21.2	1.25×10^6	1.9	潜在活性, 1.3 被激活后, ~50	0.26 2.7
A_β	低离子强度	$A_\beta \sim 320,000$ IC1 122,000	9.3	—	—	2.8	0.8
A_β	高离子强度	$A_\beta \sim 320,000$ IC1 122,000	14.3	—	—		
A_α		$A_\alpha \sim 330,000$	—	—	—	7.3	0.3

* 摘自文献[5]387页。

40% 的 α -螺旋和 20% 的 β -折叠。

用 3—10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳技术分析力蛋白 1 和它的亚基^[5], 其性质见表 5。

1982 年 Bell 分析了海胆精子鞭毛力蛋白

1 的亚基并用特异性蛋白水解酶对它作水解分析, 得到力蛋白 1 的分子模式, 见图 3。其中 A_α^{275} 切点表示 A_α 链和亚纤维 A(AT) 相互作用的区域; A_β^{115} 切点表示接近与亚纤维 B(BT) 相

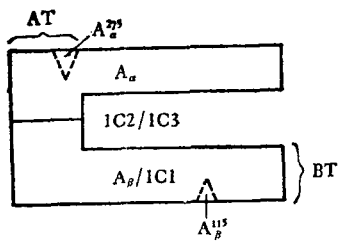


图3 力蛋白1的分子模式

互作用的 $A_{\beta}/1C1$ 复合物的端点,并与部分结合表现出的较灵敏和较高的 ATP 酶活性相符合的。

1980年 Tsuprin 报道了一种海胆 (*Strogylolocentrotus intermedicus*), 其精子鞭毛力蛋白1在电子显微镜下有二种颗粒, 一种为直径90—100 Å 的圆形颗粒, 另一种为55—60 Å 的中空矩形颗粒。

1979年 Gibbons 将力蛋白1加到去掉力蛋白臂的海胆精子中温育, 发现它可重新结合到臂的位置上去, 并可恢复打击频率 (beat frequency), 这叫功能性重组。

五、力蛋白臂的外观模式^[29]

1968年以来, 各国科学家在实验结果的基础上设想了力蛋白臂的多种外观模式, 见图4。

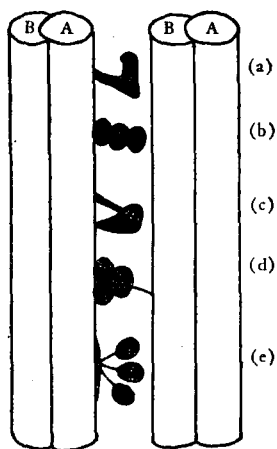


图4 力蛋白臂的多种外观模式图

- (a) 镰刀状力蛋白臂 (Allen, 1968)
- (b) 三亚基竿状力蛋白臂 (Warner, 1977)
- (c) 球棒状力蛋白臂 (1982年 Witman)
- (d) 三亚基小鼠状力蛋白臂 (Heuser)
- (e) 三球花束状力蛋白臂 (Johnson, 1983)。

Johnson^[29] 用扫描电镜观察四膜虫纤毛的30S力蛋白, 提出力蛋白分子像三个球形头连接在三根分开的绳上, 三根绳连到同一个基点上; 二个球的直径同为10nm, 第三个球的直径为12nm。整个颗粒的外观长35nm, 分子量是 $1.95 \pm 0.24 \times 10^7$, 三个球形头部形成ATP灵敏位点。

六、力蛋白和微管的关系

1. 微管蛋白对力蛋白ATP酶活性的激发作用

在力蛋白系统中加入微管蛋白或可溶性二联体溶液, 则ATP酶活性增加^[17], 结合于轴纤丝微管或脑微管的力蛋白的ATP酶活性也增加。

1976年 Hoshino 报道将猪脑微管蛋白加到四膜虫30S力蛋白系统中, 在微管蛋白和力蛋白之比为10:1范围内, ATP酶活力随微管蛋白的浓度增加而增加。无论微管蛋白存在与否, 30S力蛋白的ATP酶活性的激活能量几乎相同。增加反应介质的离子强度能抑制微管蛋白对力蛋白的激发作用; 温度高于25℃时这一激发作用消失。即使微管蛋白存在, 力蛋白对底物ATP还是很专一的。

Hoshino 用动力学分析法证明游离的力蛋白比力蛋白和底物复合物更容易结合到微管上去。这一结果和肌动蛋白-肌球蛋白的相互作用系统类似。

2. 用力蛋白修饰微管的技术测定微管的极性

微管的极性即微管聚合的方向性, 是它在结构极性的表现。1979年 Haimo 建立了直接测定微管极性的技术, 它给细胞生物学研究提供了有力的工具。

在0℃时混合微管蛋白和力蛋白, 然后升高温度, 将未聚合的物质用不连续的蔗糖密度梯度离心分离掉, 用暗视野的显微镜或电镜(负染和薄片)观察。因力蛋白臂和微管体外聚合时有一个约55°的角度, 可利用臂的这一特点来确定微管的极性。

3. 力蛋白和含有微管伴随蛋白(MAP₂)的微管之间的关系。

Haimo (1981) 证明脑微管中的 MAP₂ 可以和鞭毛的二联体微管结合, 这一结合是非专一的和松散的, 而力蛋白和二联体的亚纤维 A 的结合是在专一的位点上。如果 MAP₂ 结合二联体微管时接近或占据这个专一位点, 即可阻止力蛋白和二联体的结合, 反之即不能。当 MAP₂ 和二联体结合达到饱和, 即 1 克分子 MAP₂ 结合 29 克分子二联体微管时, MAP₂ 即阻止力蛋白结合到二联体微管上去。

4. 力蛋白对细胞分裂器中微管的修饰

ATP 可以专一地诱导分离的纺锤体中的染色体的运动, 这种染色体运动又可被抗鞭毛力蛋白的抗血清抑制。在裂解细胞模式中, 染色体的运动被低浓度钒酸盐抑制, 但它并不抑制肌球蛋白 ATP 酶。从上述实验现象可以设想纺锤体中含有力蛋白。

Sakai 和 Mohri (1976) 制备了抗海胆精子鞭毛力蛋白 1 (胰蛋白酶处理的碎片) 的抗血清, 用间接免疫荧光的方法在海胆卵的皮质部分(相当于有丝分裂器的位置)发现强荧光。这两种可能性, 一是海胆卵中确实存在力蛋白, 二是该抗血清中存在抗皮质蛋白的抗体。1978 年 Kobayashi 用抗海胆精子鞭毛力蛋白的抗血清, 用免疫沉淀法从海胆卵的皮质中提取到可被 Mg^{++} 激活的 ATP 酶, 它表现了类似鞭毛力蛋白的特性; 它的 ATP 酶活性可被抗力蛋白抗血清抑制 60—80%, 它在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中的行为相当于力蛋白 1 和 2。这一实验证实了海胆卵的皮质部分确实存在力蛋白。

1981 年 Zieve^[30] 制备了抗牛精子鞭毛力蛋白血清, 用间接免疫荧光法证明牛成纤维细胞的有丝分裂器不被染色, 该抗血清也不和培养的牛细胞中类似的高分子多肽产生免疫沉淀。这一结果说明力蛋白不是哺乳类细胞有丝分裂器的组份, 或者说哺乳类有丝分裂器中类似力蛋白的组份与鞭毛力蛋白无免疫交叉反应。

5. 滑动微管模型的假说

Satir^[31-32] (1965, 1968) 提出的这一假说

后来被不断丰富发展。根据这个模型, 纤毛和鞭毛的弯曲运动是相邻纤维的滑动, 也就是两种蛋白质之间的相互作用和滑动的结果。

根据图 2 介绍的轴纤丝结构, 二联体的亚纤维 A 和 B 共用三条原纤丝是不能滑动的。从某些不具有中央微管结构的突变种精子, 可以活动的事实推断, 中央微管在运动中不起关键作用, 这样, 就只能是二个二联体之间的滑动。

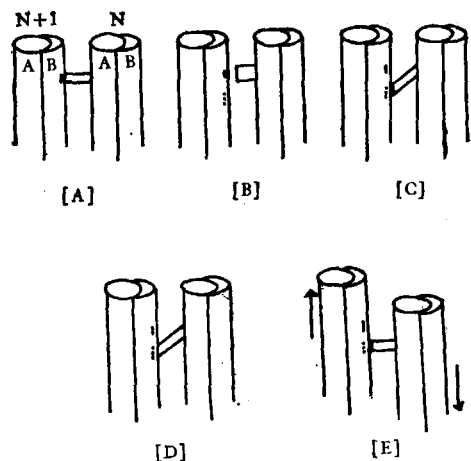


图 5 滑动微管模型示意图^[33]

N 和 N+1 分别表示相邻的二个二联体; A 和 B 分别表示亚纤维 A 和 B; N 和 N+1 的连接部分为臂

图 5 [A] 表示当 ATP 缺乏时, 二联体(N)亚纤维 A 的臂长 21nm, 附着在二联体(N+1)亚纤维 B 的第一个位点上。

[B] 当 ATP 加入后, 臂上的力蛋白使 ATP 水解, 臂的一端从二联体(N+1)亚纤维 B 上脱离下来, 并缩短了。

[C] 当 ATP 被水解完后, 臂重新伸展, 臂长 26 nm 并向基部方向形成约 39° 角度。

[D] 臂重新附着在二联体(N+1)亚纤维 B 的第二个位点上。

[E] 通过二联体(N+1)向顶端, 二联体(N)向基部的相对滑动, 臂回到平衡状态, 滑动了 16 nm, 恢复正常的臂长 21nm。

必须指出这一示意图仅包括二个二联体之间的滑动, 而整个轴纤丝的 9 个二联体的协调滑动要复杂得多。是什么因素调控着整个轴纤丝的运动? 这正是目前人们深入研究的一个课题。

七、力蛋白的其他来源

除纤毛和鞭毛外寻找力蛋白的其他来源,

实质上是探索能否用力蛋白-微管系统去解释细胞运动。

1983年 Hisanaga^[34]在蛋白酶抑制剂存在下,用几种层析法(包括钙调蛋白 Sepharose 4B 亲和层析柱法),从未受精的海胆卵中分离纯化了细胞质力蛋白,比活力为 $0.579 \mu\text{mole}$ 无机磷/分 $\cdot$ mg 蛋白。这种细胞质力蛋白由单一的高分子量多肽和低分子量多肽组成,高分子量多肽在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中和鞭毛力蛋白 A_β 链的迁移行为相同。从以下几方面看,对底物 ATP 的专一性、二价阳离子激活,低浓度钒酸盐的抑制以及和二联体微管结合等,细胞质力蛋白和轴纤丝的力蛋白十分相似。

Tominaga (1983) 证明脑微管的微管伴随蛋白中含有 ATP 酶的活性,用 DEAE-纤维素柱层析,分别用 $0.2M$ 和 $0.5M$ KCl 洗脱,可以得到含有 ATP 酶活性的二部分,定名为 ATP 酶 I 和 ATP 酶 II。

ATP 酶 I 的分子量为 $33,000$, 它的活性和稳定性依赖于天然的微管蛋白;最大活力的条件是: $1.0 \mu M$ 微管蛋白、 $0.2mM$ Mg^{++} 、 $10mM$ Ca^{++} , 对 ATP 的 $K_m \approx 0.04mM$, 对 ATP、GTP 都可以水解,对 UTP 和 CTP 也能作用。它被 $5mM$ Mg^{++} 、 $0.04M$ K^+ 、 $10^{-3}M$ 钒酸盐、 $10mM$ N-乙基顺丁烯二酰亚胺 (N-ethylmaleimide) 或 20% 甘油所抑制。

ATP 酶 II 结合于膜泡上,活力需要 $0.2-2.0mM$ Mg^{++} 、 $20mM$ K^+ ; 对 ATP 是专一的, $K_m = 0.14mM$ 。对钒酸盐的抑制作用它不敏感,但可被 $1.6mM$ N-乙基顺丁烯二酰亚胺、 20% 甘油和氯丙嗪等所抑制。

人们最感兴趣的是把 ATP 酶 I 和力蛋白的性质加以比较: ATP 酶 I 的活性象力蛋白一样受微管蛋白激发,但程度上不同,ATP 酶 I 的活性几乎完全依赖于微管蛋白;ATP 酶 I 的分子量比力蛋白小得多;两者都受钒酸盐的抑制,但抑制 ATP 酶 I 所需的浓度比力蛋白的高二个数量级。还没有研究力蛋白抗体对 ATP 酶 I 的作用,但 ATP 酶 I 是否相当于微管中的力蛋白或起类似的作用,至今还不清楚。

八、结 束 语

七十年代以来对力蛋白的研究着重于不同来源力蛋白的提纯、物理化学性质的研究、力蛋白和肌球蛋白的比较、力蛋白和不同来源微管蛋白(纤毛、鞭毛、脑和纺锤体)及与微管伴随蛋白(MAP₂)的相互作用、滑动微管模型的假说、二价阳离子对滑动微管模型的调节、以及用力蛋白直接测定微管的极性等等。这些研究从力蛋白的组成、结构、功能以及与其他蛋白质相互作用等方面着手,以便在分子生物学水平阐明纤毛和鞭毛的运动机制。

微管参与的细胞运动还有: 染色体运动、轴索运输和色素颗粒的运动等等。这些运动用微管蛋白的解聚和聚合很难解释,于是人们很自然地想到这些运动是否也是由力蛋白引起的微管的滑动,运动的能量是否来源于力蛋白水解 ATP,依赖力蛋白-微管蛋白相互作用的细胞运动机制是否有普遍性呢? 这是很多科学家关心的问题。

最近从海胆卵的细胞质中也提取到类似力蛋白的 ATP 酶^[34],在纤毛膜上也发现有力蛋白,虽然对纺锤体中是否含有力蛋白成份还有争议^[30],但是从脑微管的微管伴随蛋白中发现了具有 ATP 酶活性的蛋白质^[35-36],目前也有人开始研究海胆卵中 Ca-钙调蛋白对细胞质力蛋白的激活机制^[34],以及对四膜虫纤毛力蛋白的不同形式的激活作用^[37]。这一切预示着力蛋白和微管蛋白这一新的细胞运动系统不只局限于纤毛和鞭毛;它的研究具有广泛的前景,随着力蛋白的深入研究,与微管有关的细胞运动奥秘将会逐步揭开。

1981年 Baccetti^[38]发现有些男性不育症的患者精子鞭毛中缺少力蛋白。Ziere^[39]发现抗力蛋白血清可以抑制去膜精子的运动。Bonchard^[39]发现 EHNA (Erythro-9-[3-(2-hydroxynoryl)] adenine) 可以抑制力蛋白 ATP 酶,也可以抑制海胆精子运动。这些研究成果提示我们随着力蛋白研究的深入,有可能在分子水平上开辟治疗男性不育症和男性避孕方法的新

途径。

参 考 文 献

- [1] Gibbons, I. R. et al.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**, 697, 1960.
- [2] Gibbons, I. R.: *Arch. Biol. (Liege)*, **76**, 317, 1965.
- [3] Gibbons, I. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **50**, 1002, 1963.
- [4] Tilney, L. G. et al.: *J. Cell Biol.*, **59**, 267, 1973.
- [5] Christopher, W. B. et al.: *Methods in Cell Biology*, **24**, 373, 1982. Academic press.
- [6] Gibbons, I. R.: *J. Cell Biol.*, **26**, 707, 1965.
- [7] Thompson, G. A. et al.: *J. Cell Biol.*, **61**, 253, 1974.
- [8] Mabuchi, I. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **76**, 991, 1974.
- [9] Takahashi, M. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **84**, 1339, 1978.
- [10] David, R. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 12535, 1981.
- [11] Gibbons, I. R. et al.: *Science*, **149**, 424, 1965.
- [12] Nakamura, K. I. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **578**, 54, 1979.
- [13] Blum, J. J.: *J. Submicrosc. Cytol.*, **15**, 237, 1983.
- [14] Gibbons, I. R. et al.: *J. Cell Biol.*, **47**, 71a, 1970. (Abstr.)
- [15] Raff, E. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 366, 1969.
- [16] Ogawa, K. et al.: *Biochim Biophys. Acta*, **256**, 142, 1972.
- [17] Warner, F. D. et al.: *International Review of Cytology*, **66**, 11, 1980. Academic Press.
- [18] Blum, J. J. et al.: *J. Supramol. Struct.*, **6**, 155, 1977.
- [19] Wen-Jing Y. Tang, et al.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 508, 1982.
- [20] Ogawa, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 5793, 1976.
- [21] Fasman, G. D.: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* 3rd Edition Proteins II. p. 317 1976 by CRC Press, Inc.
- [22] Onishi, H. et al.: *J. Biochem.*, **74**, 435, 1973.
- [23] Takenaka, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 4229, 1978.
- [24] Kanazawa, T. et al.: *J. Biochem.*, **57**, 604, 1965.
- [25] Cande, W. Z. et al.: *J. Cell Biol.*, **79**, 573, 1978.
- [26] Fujiwara, A. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **92**, 441, 1982.
- [27] Blum, J. J. et al.: *J. of Supramol. Structure*, **12**, 23, 1979.
- [28] Lowey, S.: *J. Mol. Biol.*, **42**, 1, 1969.
- [29] Johnson, K. A. et al.: *J. Cell Biol.*, **96**, 669, 1983.
- [30] Zieve, G. W. et al.: *J. Cell Sci.*, **48**, 241, 1981.
- [31] Satir, P.: *Protoplasmatologia*, III. E. 52pps, 1965.
- [32] Satir, P.: *J. Cell Biol.*, **39**, 77, 1968.
- [33] Satir, P. et al.: *Cell Motility*, **1**, 303, 1981.
- [34] Hisanaga, S. I. et al.: *J. Biochem.*, **93**, 87, 1983.
- [35] Tominaga, S. I. et al.: *J. Biochem.*, **93**, 1085, 1983.
- [36] Tominaga, S. I. et al.: *J. Biochem.*, **93**, 1093, 1983.
- [37] Blum, J. J. et al.: *J. Submicrosc. Cytol.*, **15**, 237, 1983.
- [38] Baccetti, B. et al.: *J. Cell Biology*, **88**, 102, 1981.
- [39] Bouchard, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **78**, 1033, 1981.

[本文于 1984 年 2 月 7 日收到]

胰岛素作用机制研究的新进展

王 志 珍

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

胰岛素是脊椎动物胰脏 β 细胞分泌的一种重要的激素, 具有极其广泛的生理功能。在细胞水平, 它刺激葡萄糖和氨基酸的传递和利用, 激活许多重要的酶, 抑止脂肪分解, 改变蛋白质的磷酸化作用, 刺激蛋白质和核酸的合成, 促进细胞的生长和分化等。这些作用发生在细胞膜, 细胞质和各种亚细胞器的不同水平上, 并有不同的时间响应。譬如, 胰岛素作用后几秒钟内就可以发生刺激葡萄糖传递的现象, 但 DNA

的合成则要在 16—20 小时后才达到高潮。不同的生物功能对胰岛素数量的要求也很不同, 可以从 $10^{-11}M$ 到 $10^{-7}M$, 差别可达四个数量级。一般说来, 比较缓慢的过程要求的胰岛素浓度较高^[1]。随着研究的深入, 很可能还会发现胰岛素更多的今天还没有认识到的新的生物功能。然而, 它是通过什么途径发挥如此多种不同的生物功能的呢? 也就是说胰岛素的作用机制是怎样的呢? 这个问题已经成为近十几年